

**Der Einfluß des Glucagons auf den
Glucose-Stoffwechsel
des epididymalen Fettgewebes der
Ratte in vitro im Vergleich mit dem
des Insulins**

Hans Wörner

1964

**Der Einfluß des Glucagons auf den
Glucose-Stoffwechsel
des epididymalen Fettgewebes der
Ratte in vitro im Vergleich mit dem
des Insulins**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

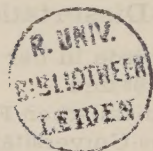
Hans Wörner
aus Stuttgart

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL
Mitberichterstatter: Professor KIESE, Professor WERLE
Dekan: Professor Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1961



DISPOSITION

MEINEN LIEBEN ELTERN
GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISPOSITION

A) Einleitung

- 1) Kurze Literaturübersicht über bisherige Stoffwechseluntersuchungen mit Glucagon
- 2) Die Bedeutung des Fettgewebes für den Kohlenhydrat-Stoffwechsel und der Einfluss des Insulins darauf

B) Methode und Überprüfung ihrer Anwendbarkeit und Fehlerbreite

C) Ergebnisse der Untersuchungen über den Einfluss des Glucagons und des Insulins

D) Diskussion

E) Zusammenfassung

F) Literatur

A) EINLEITUNG

In den letzten Jahren wurden ausgedehntere Studien über die Stoffwechselwirkung des Glucagons, des hyperglycämisierenden Faktors aus Pankreasextrakten (HGF), durchgeführt, ohne dass seine Rolle im Stoffwechselgeschehen bisher aufgeklärt werden konnte (1, 2, 3, 4, 5).

Bei den Untersuchungen am gesunden Menschen und am Tier stand stets der Effekt auf die Leber im Vordergrund, in der Glucagon durch die Aktivierung des Phosphorylasensystems eine Glycogenolyse (6, 7, 8) und somit eine kurzfristige Steigerung der Blutzuckerkonzentration herbeiführt. Die Beurteilung einer Wirkung auf die peripheren Gewebe - Muskel- und Fettgewebe wurde dadurch erheblich erschwert.

ELRICK (9, 10, 11) berichtete erstmals über eine Förderung der Glucoseverwertung in der Peripherie durch HGF. Seine Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an gesunden und zuckerkranken Versuchspersonen sowie intakten und pankreatektomierten Hunden. Er stellte dabei nach Glucagon-Injektionen grössere Differenzen zwischen arterieller und venöser Blutzuckerkonzentration fest als nach Glucose-Infusionen, ausserdem nach kombinierten Insulin-Glucagon-Injektionen grössere als nach Insulingaben allein. Während SCHWAMM (12) diese Befunde bestätigen konnte, fanden ITALLIE (13) sowie BONDY und CARDILLO (14) keine sichere Wirkung des HGF auf die periphere Glucose-Utilisation. Sie betonten, dass Glucagon auf die periphere Glucose-Utilisation keinen grösseren Effekt habe als die durch dieses Hormon induzierte Hyperglykämie selbst. WEINGES (15, 16, 17) fand bei gesunden Versuchspersonen mit einem protrahiert wirkenden Glucagon-Zink-Komplex in Dosen von 2 mg Glucagon i. m. bei fehlendem hyperglykämischem Effekt eine ausgleichende Wirkung auf den Blutzuckerspiegel, einen Abfall des anorganischen Serumphosphates, der Gesamtaminosäuren und der nichtveresterten Fettsäuren im Serum über einen Zeitraum von etwa 6 - 9 Stunden p. I.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Glucagon auch einen extrahepatischen Effekt besitzt, und dass die kurzfristige Hyperglykämie allein für weitere Stoffwechseleffekte nicht verantwortlich gemacht werden kann.

Andere Untersucher konnten keinen Einfluss des Glucagons auf den Stoffwechsel peripherer Gewebe in vivo feststellen (18, 19, 20, 21).

Bei Untersuchungen an isolierten Geweben fanden CANDELA (22) und SNEDECOR (23) eine Hemmung des Insulineffektes durch Glucagon. Sie prüften die Glucose-Aufnahme und die Glycogen-Zunahme des Rattenzwerchfells. RANDLE (24) beschrieb dagegen eine signifikante Stimulation der Glucose-Aufnahme des Rattenzwerchfells durch 20 γ /ml Glucagon. Gleiche Ergebnisse wurden auch von NAUGHT (25) an Schnitten der laktierenden Rattenmamme gefunden. Sowohl RANDLE wie auch NAUGHT fanden diesen insulinähnlichen Effekt am isolierten

Gewebe jedoch nicht, wenn sie Glucagon mit Cystein vorbehandelten, und dadurch das in geringen Spuren vorhandene Insulin zerstörten. In vorliegender Arbeit wurde die Wirkung Insulin-freien Glucagons auf den Glucose-Verbrauch des Rattenfettgewebes *in vitro* untersucht und mit dem Insulin-Effekt verglichen.

Die Bedeutung des Fettgewebes für den Kohlenhydrat- und Fett-Stoffwechsel wurde besonders durch Arbeiten von MIRSKI (26), TUERKISCHER (27), WERTHEIMER (28), SHAPIRO (29, 36), FAWCETT (30), RENOLD (31), ENGEL (18), KRAHL (32), HAUGAARD (33), HAUSBERGER (34, 35), MILSTEIN (37), ITZHAKI (38), WINEGRAD (39) hervorgehoben. Danach besitzt dieses Gewebe im Gegensatz zu früheren Vorstellungen einen sehr lebhaften intermediären Stoffwechsel. So konnte im Fettgewebe des intakten Tieres und im isolierten System die Glycogen-Synthese aus Glucose (27, 30, 31, 18), die Oxydation von Glucose (34, 39), Pyruvat und Acetat (39) sowie die Fettsäure-Synthese aus Glucose, Acetat und Propionat (35, 40, 41, 39) nachgewiesen werden. - Diese Stoffwechselvorgänge werden durch Insulin direkt in hohem Masse aktiviert, wie Versuche am Gesamtorganismus und am isolierten Gewebe gezeigt haben. Im einzelnen stimuliert Insulin dabei *in vivo* die Glycogenzunahme des Fettes (27, 30, 31, 18) und die lokale Hypertrophie der Fettzellen (42), *in vitro* den Sauerstoffverbrauch des Fettgewebes (33), die Glucose-Aufnahme (32, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 47), die Glucose-Oxydation (34, 37, 39, 43, 45), die Fettsäurebildung (34) und die Lipogenese (39). Damit hat dieses, für den Kohlenhydrat- und Fett-Stoffwechsel wichtigste Hormon nach WINEGRAD (39) im Fettgewebe wahrscheinlich einen seiner Hauptangriffspunkte. - Besonders empfindlich auf kleinste Insulin-Konzentrationen reagiert der Glucose-Stoffwechsel des Fettgewebes *in vitro*. Dabei besteht einmal die Möglichkeit, die aus dem Inkubations-Medium aufgenommene Glucose zu bestimmen, und zum andern die Glucose-Oxydation mit C-1-markierter Glucose zu messen. Nach MARTIN (43) wird dabei die Glucose-Aufnahme maximal bis auf das 4-fache, die $C^{14}O_2$ -Produktion aus Glucose-1- C^{14} bis auf das 8-fache des Grundwerts gesteigert.

Auf Grund dieser Kenntnisse lässt sich bei bekannter Dosis-Wirkungs-Relation eine biologische Methode der Insulin-Bestimmung aufbauen (43, 45, 46, 47, 48). Diese wurde in modifizierter Form bei dem Vergleich zwischen Glucagon- und Insulinwirkung in vorliegender Arbeit angewandt. Deshalb wurden zunächst einmal Untersuchungen über die Methode selbst zur Kontrolle der eigenen Genauigkeit angestellt.

B) METHODE

1. Die Bestimmung der $C^{14}O_2$ -Produktion aus D-Glucose-1- C^{14}

a. Inkubationsgefäße:

18 Glasfläschchen von 20 mm Durchmesser und 40 mm Höhe werden mit doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen. In den beiden Bohrungen stecken zwei kurze Glasrohre, die mit Gummihütchen verschlossen sind. Ein Drahthäkchen an der Unterseite des Gummistopfens hält ein Plastikschälchen, das später eine Hymine-Lösung zur Bindung der entstandenen $C^{14}O_2$ aufnimmt.

Alle verwendeten Glasgeräte werden sorgfältig mit Bichromschwefelsäure gereinigt und mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Quarzapparatur mit Zusatz von Titriplex (Bayer) gespült.

b. Inkubationsmedium:

Krebs-Ringer-Pufferlösung (KRP) von folgender Zusammensetzung:

- 4 ml 0,154 m KCl (1,15 %)
- 3 ml 0,110 m $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (1,22 %)
- 1 ml 0,154 m $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (3,82 %)
- 1 ml 0,154 m KH_2PO_4 (2,11 %)
- 100 ml 0,154 m NaCl (0,9 %)
- 21 ml 0,154 m $NaHCO_3$ (1,3 %) (30 Min. lang kräftig mit CO_2 durchströmt und luftdicht aufbewahrt)

mit einem Glucosegehalt von 250 mg% und einem Zusatz von 1 % Gelatine. Die Lösungen werden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Quarzapparatur hergestellt, einzeln in braunen Schliff-Flaschen aufbewahrt und alle 4 Wochen frisch hergestellt. Die Pufferlösung wird jeweils kurz vor Versuchsbeginn hergestellt und 5 Min. mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) durchströmt. Es stellt sich so ein pH zwischen 7,4 und 7,5 ein. Im weiteren Versuchsverlauf ist darauf zu achten, dass möglichst wenig CO_2 abdampfen kann (Gefäße also gleich verschliessen), sonst wird der pH alkalisch.

Mit dieser KRP werden Insulin-Verdünnungsreihen aus einer Stammlösung (20 IE/ml) hergestellt. Die Stammlösung (8 mg eines hochgereinigten, doppelt umkristallisierten, Glucagon-freien Rinder-Insulins, 25 E = 1 mg, in 10 ml HCl pH 2,7) ist im Kühlschrank 5 Tage haltbar. Das untersuchte Glucagon war ein hochgereinigtes kristallines Präparat (N. V. Organon, Oss/Holland). Um darin noch enthaltene Spuren von Insulin zu inaktivieren, wurde es nach STAUB (49) mit Cystein vorbehandelt. (Eine 1 % Cystein-Lösung in aqua bidest wird mit wenigen Tropfen 10 % NaOH auf pH 7,5 gebracht. - 4 mg Glucagon werden in 2 ml n/10 NaOH gelöst und mit 2 ml n/10 HCl auf pH 7,5 eingestellt. 3,5 ml der 1 % Cystein-Lösung vom pH 7,5 und 1,5 ml aqua bidest werden zugegeben). Nach 16 stündiger Einwirkung bei Zimmertemperatur wird diese Glucagon-Stammlösung (400 γ /ml Glucagon, 3,5 mg/ml Cystein) mit KRP entsprechend verdünnt. Die unverminderte blut-

zuckersteigernde Aktivität des Glucagons C (C = Cystein behandelt) wurde laufend an normalen nüchternen Kaninchen überprüft. Nach intravenöser Injektion von 1 γ Glucagon C/kg Körpergewicht wurden regelmässig Blutzucker-Steigerungen von 30 - 60 mg% ermittelt. Zum Nachweis der Insulin-Inaktivierung durch Cystein wurde eine entsprechende Cystein-Behandlung des Insulins durchgeführt (10000 μ E/ml Insulin, 3, 5 mg/l Cystein).

D-Glucose-1-C¹⁴ (Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England) wird in bidestilliertem Wasser aus einer Quarzapparatur gelöst (0,05 mC/25 ml) und in gefrorenem Zustand aufgehoben, damit keine bakterielle Zersetzung und damit ein Aktivitätsverlust eintritt.

Jeder Inkubationsansatz enthält 2 ml KRP, Insulin-KRP oder Glucagon-KRP und 0,1 ml D-Glucose-1-C¹⁴ (0,2 mikro Curie).

c. Versuchstiere:

Männliche Albino-Ratten mit einem Gewicht von 150 - 200 g (etwa 3 Mon. alt), denen bis Versuchsbeginn ad libidum ein Spezialfutter "Altromin" gegeben wurde.

d. Präparation des Fettgewebes:

Für einen Versuch werden 3 Ratten dekapitiert und entblutet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle ist das Fettgewebe am kranialen Pol des Nebenhodens leicht zu finden. Es wird distal der deutlich sichtbaren Arterie mit einer Pinzette gefasst und mit einem Scherenschlag abgetrennt. Unter grösstmöglicher Schonung des Gewebes schneidet man nun von jeder Seite 3 etwa gleich grosse Zipfel (80 - 140 mg) ab und lässt sie nacheinander sofort in 6 vorbereitete Inkubationsmedien fallen.

Auf diese Weise kann man 6 verschiedene Lösungen in ihrer Wirkung auf das Fettgewebe einer Ratte vergleichen. Zur Ermittlung des Fettgewichtes werden die Inkubationsgefässe mit der Inkubationslösung vor und nach der Zugabe der Fettzipfel gewogen. Um genauere Ergebnisse zu erhalten, wird jede der 6 Einzelbestimmungen 3-fach ausgeführt (3 Ratten) und eine gleichmässig vertauschende Verteilung der nacheinander abgeschnittenen Gewebs-Segmente vorgenommen, sodass jede untersuchte Konzentration auf einen peripheren Gewebsabschnitt der einen Ratte, einen mittleren der zweiten und einen zentralen der dritten Ratte einwirken kann. Anschliessend werden die Gefässe sofort luftdicht verschlossen und über zwei Kanülen Nr. 12 durch die Gummihütchen hindurch nochmals 5 Min. mit Carbogen beatmet.

Die Inkubation erfolgt bei 37° C in einem Dubnoff-Inkubationsschüttler oder einem Warburg'schen Gerät mit entsprechendem Einsatz und einer Schüttelfrequenz von 70 - 80/Min.

e. Messung der C¹⁴O₂:

Nach 3-stündiger Inkubationsdauer der luftdicht abgeschlossenen Gefässe spritzt man mit einer 2 ml-Spritze und feiner Kanüle durch die Gummihütchen hindurch in jedes Plastikschälchen 0,4 ml Hyaminelösung (alkalisches Absorptions-

mittel für CO_2 , hergestellt nach F. Eisenberg (50)) und danach mit einer anderen Spritze 0,25 ml 10 % H_2SO_4 in das Inkubations-Medium, um die C^{14}O_2 auszu-treiben. Nach weiterer 2-stündiger Schütteldauer öffnet man die Gefäße und spült die Hyamine-Lösung aus den Plastikschälchen mit 8 ml Scintillationslösung (2 g Diphenyloxazole + 50 mg 1,4-Bis-2(5-phenyloxazolyl)-Benzene der Firma TRA-CERLAB INC., WALTHAM/MASS. in 500 ml Toluol p.a. MERCK) über einem Trichter in 20 ml Glasbehälter mit Schraubverschluss (Fiolaxglas, Fa. OSON Glas-waren, CRAILSHEIM/WTTBG.). Die gewonnene Radioaktivität wurde in einem Liquid-Scintillation-Spectrometer (PACKARD INSTRUMENT COMPANY, LA GRANGE/ILLINOIS) gemessen. Nach Abzug der Impulse des Leerwertes (0,4 ml Hyamine in 8 ml Scintillations-Lösung) errechnet man die Impulse pro Minute pro mg Fettgewebe (I/M/mg) als Mass für die Menge entstandener C^{14}O_2 .

f. Versuchsdauer: 8 Std.

2. Die Bestimmung der Glucose-Aufnahme (GA)

Die Bestimmung erfolgt nicht radioaktiv und unterscheidet sich von der oben beschriebenen Methode durch eine Verringerung des Inkubations-Mediums von 2,1 ml auf 0,7 ml. Bei gleichen Fettgewebsanteilen werden dadurch die Glucose-Konzentrations-Differenzen nach der Inkubation vergrößert und damit genauere Ergebnisse erhalten. Aus Doppelbestimmungen für jede der 6 Anfangs-Zucker-Konzentrationen und jede der 18 End-Zucker-Konzentrationen nach 3-stündiger Inkubation im Warburg wird die GA ermittelt. Sie wird ausgedrückt in mg Glucose pro Stunde pro g Fettgewebe (mg/h/g). Die Glucose-Konzentrationen wurden photometrisch in Anlehnung an die von HUGGET (51) beschriebene enzymatische Methode bestimmt. Der mittlere Fehler der Einzelbestimmung betrug bei 820 Doppelbestimmungen $\pm 2,5$ mg%.

Versuchsdauer: 7 Stunden.

3. Genauigkeit der Methode

In Anlehnung an die Arbeiten von DITSCHUNEIT und PFEIFFER (45) sowie HUMBEL (46) und FROESCH (47) wurden Insulinkonzentrationen von 62, 5-125-250-500-1000 mikro-Einheiten und 10-100-1000 mikro-Einheiten für Eichkurven gewählt, um die eigene Genauigkeit mit der bisher bekannten vergleichen zu können.

Die auf Abbildung 1A und B wiedergegebenen 6 bzw. 2 Versuche mit den Mittelwerten aus 90 bzw. 30 Einzelbestimmungen zeigen die lineare Regression zwischen dem Logarithmus der Insulinkonzentration und der Quadratwurzel der gewonnenen Impulse/Min/mg Fett (A) (MARTIN (43)) bzw. bei der Messung der GA mg Glucose /h/g Fett (B) (HUMBEL (46)).

Wie bei jeder biologischen Bestimmung streuen die erhaltenen Messwerte um die berechnete Regressionsgerade. Die hierbei auftretenden Fehler sind aus Tab. 1

zu ersehen. Die angegebenen Impulszahlen sind die Mittelwerte der 3 Ratten eines Versuchs. Als Mass für die Steilheit der Eichgeraden wurde der Regressionskoeffizient

$$b = \frac{\sum (x \cdot y) - \bar{y} \sum (x)}{\sum (x^2) - \bar{x} \sum (x)}$$

errechnet. Er bedeutet graphisch den Tangens des Winkels zwischen der x-Achse und der Eichgeraden. Als Kriterium für die Genauigkeit, mit der die einzelnen y-Werte der Eichkurve auf einer geraden Linie, der Eichgeraden liegen, wurde

der Korrelationskoeffizient $r = b \cdot \frac{S(x)}{S(y)}$

das Bestimmtheitsmass r^2

und der Genauigkeitsindex $\lambda = \frac{(Sb)}{b}$

ermittelt, wobei $(Sb)^2 = \frac{1}{n-2} [\sum y^2 - \bar{y} \sum y - b (\sum (xy) - \bar{x} \sum y)]$

berechnet wird.

In den Formeln bedeutet:

x = lg Insulinkonzentration, $\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert der x-Werte.

y = Quadratwurzel aus I/M/mg bzw. lg der I/M/mg.

$\bar{y}$ = arithmetisches Mittel der y-Werte.

Standardabweichung $S_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$ bzw. $S_y = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-1}}$

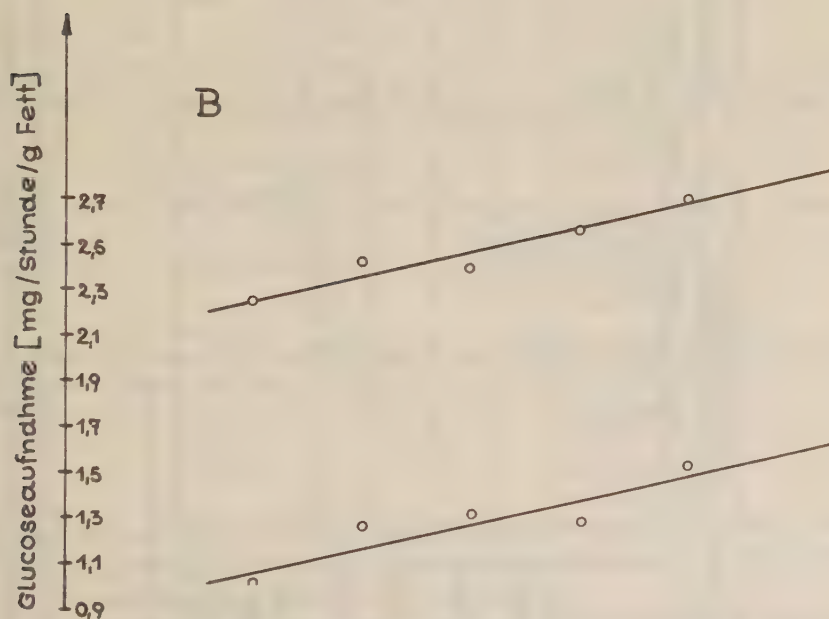
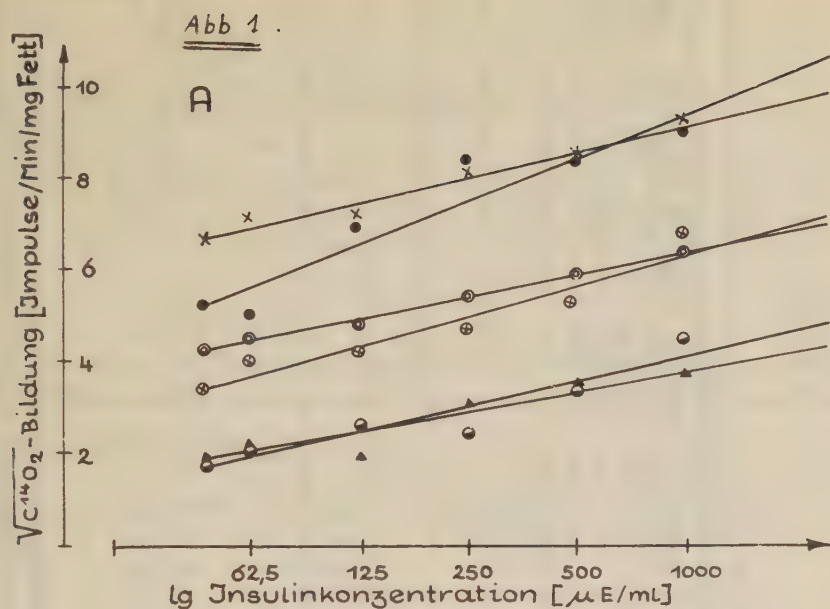
n = Zahl der verglichenen Grössen (in Tab. 1 $n = 5$).

Für den Grenzfall, dass alle Messpunkte mit der Eichgeraden zusammenfallen, wird r und $r^2 = 1$, $\lambda = 0$. Bei den aufgeführten Versuchen liegt r^2 zwischen 0,69 und 0,97, λ zwischen 0,10 und 0,37.

Bei den beiden Bestimmungen der GA betrug r^2 0,80 und 0,91, λ 0,27 und 0,17.

Aus Tab. 1 ist weiterhin zu entnehmen, dass nicht nur die Korrelation des Logarithmus der Insulin-Konzentration mit der Quadratwurzel aus I/M/mg eine lineare Regression ergibt, sondern auch der lg von beiden. Die einzelnen Werte wurden zum Vergleich nebeneinander aufgeführt. Da bei der Bestimmung der GA ebenfalls die Korrelation von lg Insulin-Konzentration zu lg mg/h/g eine lineare Regression ergab, wurde für einen Vergleich der Genauigkeit beider Methoden diese Komponenteneinteilung gewählt. (Um nicht mit negativen lg rechnen zu müssen, wurden die erhaltenen Ergebnisse der GA mit 10 multipliziert).

ABBILDUNG 1



Graphische Darstellung der Wirkung verschiedener Insulinkonzentrationen auf die Bildung radioaktiver C^{14}O_2 aus D-Glucose-1- C^{14} (A) und den Glucoseverbrauch (B) durch das isolierte epididymale Rattenfettgewebe.

TABELLE 1:

Insulinkonzentration ($\mu\text{E/ml}$)	$\sqrt{\text{Impulse/min. / mg Fett}}^+ = \sqrt{I}$ und $\log(\text{Impulse/min. / mg Fett})^+ = \log(I)$									
	$\sqrt{I}$	$\log(I)$	$\sqrt{I}$	$\log(I)$	$\sqrt{I}$	$\log(I)$	$\sqrt{I}$	$\log(I)$	$\sqrt{I}$	$\log(I)$
1000	6,91	1,68	4,47	1,30	6,54	1,63	4,60	1,33	3,60	1,11
500	5,36	1,46	3,65	1,12	5,98	1,55	3,42	1,07	3,55	1,10
250	4,81	1,37	3,56	1,10	5,45	1,47	2,46	0,78	3,39	1,06
125	4,16	1,24	3,77	1,15	4,92	1,38	2,70	0,86	2,39	0,76
62,5	4,10	1,23	3,18	1,00	4,57	1,32	2,10	0,64	2,59	0,83
Regressionskoeffi- zient (b)	2,26	0,37	0,82	0,19	1,64	0,26	1,90	0,53	1,05	0,30
Korrelationskoeffi- zient (r)	0,93	0,95	0,83	0,83	0,99	0,99	0,92	0,93	0,88	0,87
Bestimmtheitsmass (r^2)	0,87	0,91	0,69	0,69	0,97	0,99	0,84	0,87	0,77	0,75
Genauigkeitsindex (λ)	0,21	0,17	0,37	0,37	0,10	0,03	0,24	0,21	0,30	0,32
Zahl der Einzel- bestimmungen	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Nr. der Unter- suchung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	15

+ Mittelwert von 3 Einzelbestimmungen

Messwerte der C^{14}O_2 -Bildung des isolierten epididymalen Rattenfettgewebes unter dem Einfluss 5 verschiedener Insulin-konzentrationen zwischen 62,5 und $1000 \mu\text{E/ml}$ aus 9 Versuchen mit berechneten Regressionskoeffizienten, Korrelationskoeffizienten, Bestimmtheitsmassen und Genauigkeitsindizes.

TABELLE 2:

 $C^{14}O_2$ -Bildung aus D-Glucose-1- C^{14} (I = Impulse/Min/mg Fett)

Ins. Konz. ($\mu E/ml$)	I^+	$\sqrt{I}$	lg I	I	$\sqrt{I}$	lg I	I	$\sqrt{I}$	lg I	I	$\sqrt{I}$	lg I
1000	113,5	10,66	2,06	135,0	11,62	2,13	68,4	8,27	1,84	112,6	10,60	2,05
100	52,97	7,28	1,72	46,4	6,81	1,67	32,1	5,71	1,51	55,6	7,45	1,75
10	30,7	5,54	1,49	22,7	4,77	1,36	13,7	3,70	1,14	29,9	5,47	1,48
0	23,9			16,3			14,4			15,4		
b		2,56	0,29		3,43	0,39		2,29	0,35		2,57	0,29
r		0,99	0,99		0,98	0,99		0,99	0,99		0,99	0,99
r^2		0,97	0,98		0,95	0,98		0,99	0,99		0,98	0,99
λ		0,26	0,10		0,33	0,16		0,10	0,07		0,19	0,04
Nr. d. Vers.	22a			23a			24a			25a		

Glucose-Aufnahme (GA = mg Glucose/Std/g Fett)

Ins. Konz. ($\mu E/ml$)	GA^+	lg	GA	lg	GA	lg	GA	lg
1000	1,78	1,25	1,76	1,25	1,08	1,03	1,95	1,29
100	1,06	1,03	0,92	0,96	0,60	0,78	1,01	1,00
10	0,74	0,87	0,62	0,79	0,38	0,58	0,66	0,82
0	0,73		0,50		0,33		0,55	
b	0,52	0,19	0,57	0,23	0,35	0,23	0,65	0,23
r	0,98	0,99	0,97	0,99	0,98	0,99	0,97	0,99
r^2	0,96	0,99	0,94	0,97	0,95	0,99	0,94	0,97
λ	0,32	0,13	0,39	0,21	0,30	0,05	0,37	0,16
Nr. d. Vers.	22b		23b		24b		25b	

$$\frac{C^{14}O_2}{GA} = \frac{C^{14}O_2\text{-Impulszahl/Min/mg Fett}}{\text{mg Glucose/Std/g Fett}}$$

Ins. Konz. ($\mu E/ml$)				
1000	64,0	77,0	63,4	57,8
100	50,0	50,5	53,4	55,0
10	41,5	36,7	36,0	45,3
0	32,7	32,6	43,6	28,0

+ Mittelwert von 3 Einzelbestimmungen

Messwerte der $C^{14}O_2$ -Bildung und des Glucoseverbrauchs des isolierten epididymalen Rattenfettgewebes aus dem gleichen Inkubationsansatz bei 4 Versuchen unter Insulinkonzentrationen von 10 - 1000 $\mu E/ml$.

Angabe des Regressionskoeffizienten, des Korrelationskoeffizienten, des Bestimmtheitsmasses, des Genauigkeitsindex und des Verhältnisses $C^{14}O_2$ -Impulszahl/Min/mg Fett zu Glucoseaufnahme (mg Glucose/Std/g Fett).

Für einen exakten Vergleich der $C^{14}O_2$ -Produktion mit der GA wurden kombinierte Versuche angestellt, bei denen aus dem gleichen Ansatz sowohl die $C^{14}O_2$ -Produktion als auch die Gesamtglucose-Aufnahme gemessen wurde.

Dazu wurde die Versuchsanordnung etwas abgeändert. Es wird nur 1 ml Inkubations-Medium mit 0,1 μC /ml Radioaktivität verwendet und nach 3 Std. Inkubation im Warburg mit nur 0,15 ml 10 % H_2SO_4 versetzt. (Durch die Schwefelsäure werden die Glucose-Konzentrationen nur verdünnt, es kommt zu keiner nachweisbaren Hydrolyse des Fett-Glycogens).

Um Fehler bei der Glucose-Bestimmung auszuschliessen, wurden auch den Anfangszuckerlösungen 0,15 ml H_2SO_4 /ml zugesetzt und diese Verdünnung später bei der Berechnung der Glucose-Konzentrationen durch den Faktor 1,15 ausgeglichen. Die Glucose-Bestimmung erfolgte am Ende der 2-std. CO_2 -Austreibeperiode.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden Insulin-Konzentrationen von 10-100-1000 mikro-Einheiten verwandt. Aus Tab. 2 sind die Ergebnisse von 4 kombinierten Bestimmungen mit 2×48 Einzelbestimmungen zu ersehen. Bei der Angabe der $C^{14}O_2$ -Produktion wurden sowohl die I/M/mg als auch deren Quadratwurzel und Logarithmus, und bei der GA neben mg/h/g auch deren Logarithmus aufgeführt. Die Regressionskoeffizienten lagen bei der $C^{14}O_2$ -Messung mit 0,29 - 0,39 deutlich höher als bei der GA mit 0,19 - 0,23. Das Bestimmtheitsmass (r^2) zeigte dagegen keine Unterschiede ($C^{14}O_2 = 0,98 - 0,99$, GA = 0,97 - 0,99), der Genauigkeitsindex ergab ebenfalls praktisch übereinstimmende Werte ($C^{14}O_2 = 0,04 - 0,16$ GA = 0,05 - 0,21). Wie schon aus dem Vergleich der Regressionskoeffizienten zu ersehen ist, stieg das Verhältnis zwischen $C^{14}O_2$ -Impulsen pro Min. pro mg Fett und der GA (mg/h/g) mit steigender Insulin-Konzentration an und betrug bei 1000 mikro-Einheiten/ml etwa das Doppelte des Leerwertes.

In 16 radioaktiven Versuchen ergab sich für Eichkurven von 10 - 1000 mikro-Einh./ml Insulin ein Genauigkeitsindex (λ) von $0,22 \pm 0,03$, errechnet aus der Korrelation zwischen lg Insulin-Konzentration und lg I/M/mg. In 9 GA-Versuchen (lg) betrug er $0,18 \pm 0,03$. Damit konnte die von MARTIN (43) ($\lambda = 0,31$) und DITSCHUNEIT (45) ($\lambda = 0,28$) angegebene Genauigkeit der $C^{14}O_2$ -Bestimmung erreicht werden.

Die Fehlerbreite beider Methoden zeigte somit keine grösseren Unterschiede. Die Messung der $C^{14}O_2$ -Produktion scheint jedoch für die Insulin-Bestimmung spezifischer zu sein als die Messung der Glucose-Aufnahme (48).

C) ERGEBNISSE

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit 90 Einzelbestimmungen, bei der die $C^{14}O_2$ -Produktion des Fettgewebes unter dem Einfluss Cystein- behandelten und unbehandelten Insulins und Glucagons verglichen wurde.

Insulin wird dabei fast vollständig durch Vorbehandlung mit Cystein inaktiviert. 1000 $\mu E/ml$ Insulin steigerten die Impulszahl pro Min. pro mg Fettgewebe ($I/M/mg$) auf 740 % des Leerwertes, Insulin C zeigte dagegen mit 134 % keinen signifikanten Unterschied ($t = 2,48$, $p > 0,01$) zum Leerwert.

Eine deutliche Differenz fand sich auch zwischen 40 γ/ml unbehandeltem (506 %) und behandeltem Glucagon (286 %). Glucagon C verursachte aber noch eine statistisch gesicherte ($t = 4,6$, $p < 0,001$) Steigerung der $C^{14}O_2$ -Produktion.

Der mutmassliche Insulingehalt von 40 γ des getesteten Glucagon-Präparates (Nr. 2564) war 150 μE Insulin (gewichtsmässiger Anteil $\approx 0,1\%$), wenn man annimmt, dass die Wirkungen der beiden Hormone sich einfach addierten (siehe S. 21). Er lässt sich dann nach einfachen Gesetzen der analytischen Geometrie errechnen aus der linearen Korrelation zwischen $\lg$ Insulin-Konzentration und $\lg I/M/mg$.

40 γ Glucagon lagen danach in Höhe von 160 μE Insulin und 40 γ Glucagon C in Höhe von 10 μE Insulin.

Der Glucagon-Effekt auf die Glucose-Aufnahme (GA), gemessen in mg -Glucose/Std/g Fettgewebe ($mg/h/g$) ist aus Tab. 4 zu ersehen. Gegenüber dem Leerwert ($\approx 100\%$) steigerten hier 40 γ/ml Glucagon C die GA auf 331 % und unbehandeltes Glucagon hatte die gleiche Wirkung (488 %) wie 1000 $\mu E/ml$ Insulin (485 %). Der mutmassliche Insulin-Gehalt dieses Glucagon-Präparates (Nr. 2101) war 900 μE Insulin/40 γ Glucagon (gewichtsmässig $\approx 1\%$). 40 γ Glucagon lagen nach der Berechnung in Höhe von 1000 μE Insulin, 40 γ Glucagon C in Höhe von 100 μE Insulin. Insulin C war auch bei diesem Versuch ohne Effekt.

In einer weiteren Versuchsreihe war nun festzustellen, in welcher geringsten Konzentration Glucagon C noch auf die $C^{14}O_2$ -Produktion wirkt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe mit 40-4-0,4-0,04 γ/ml Glucagon C hergestellt und mit der Wirkung von 10 $\mu E/ml$ Insulin sowie dem Leerwert verglichen.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse von 90 Einzelbestimmungen. Während eine Konzentration von 0,04 γ/ml Glucagon C keine Wirkung mehr zeigte, verursachten 0,4 γ/ml eine signifikante Steigerung der $C^{14}O_2$ -Produktion auf 164 % gegenüber dem Leerwert. Bei dem Vergleich der Wirkung von 0,4-4-40 γ/ml Glucagon C zeigte sich, wenn auch in weitaus geringerem Umfang als bei Insulin, eine Dosis-Wirkungsrelation. Eine 10-fache Erhöhung der Glucagon-Konzentration führte zu einer ungefähr 1,25-fachen Erhöhung der gemessenen $C^{14}O_2$ -Im-

TABELLE 3:

 ^{14}C - Bildung aus D-Glucose-1- ^{14}C (Impulse/Min/mg Fett)

Konzentration pro ml	1000 μE Insulin	10 μE Insulin	0 μE Leerwert	1000 μE Ins. C	40 γ Glucagon	40 γ Glu. C.	Ratte Nr.
Imp/Min/mg Fett							
	79,8	17,6	13,4	30,9	36,9	17,4	1
	111,4	13,2	15,0	22,6	59,0	33,2	2
	81,0	26,2	19,5	21,2	49,5	38,8	3
	39,4	16,7	14,9	12,2	21,1	14,0	4
	125,0	55,3	13,7	11,6	116,0	60,4	5
	86,0	51,0	16,9	16,2	46,0	16,6	6
	219,0	51,0	12,4	11,6	116,5	81,0	7
	91,3	41,7	21,1	18,7	52,0	32,7	8
	126,0	40,6	18,4	22,5	118,0	46,6	9
	125,0	81,3	18,7	24,7	110,0	64,5	10
	141,5	101,0	20,5	28,0	139,5	68,5	11
	206,0	120,0	15,8	32,3	154,0	46,5	12
	126,7	25,6	19,6	18,9	65,0	34,7	13
	144,0	15,8	14,0	27,0	105,3	46,2	14
	172,2	51,3	19,4	40,5	94,0	74,4	15
Mittelwert	124,96 + 12,4	47,22 + 8,3	16,89 + 0,75	22,59 + 2,15	85,52 + 10,5	45,05 + 6,1	
% des Leerwerts	740 + 74	280 + 49	100 + 4	134 + 13	506 + 62	266 + 36	
t	8,7	3,64	-	2,48	6,5	4,6	
p				> 0,01		< 0,001	

Messwerte der C^{14}O_2 -Bildung des isolierten epididymalen Rattenfettgewebes unter unbehandeltem Insulin und Glucagon sowie unter Cystein-behandeltem (C) Hormonen im Vergleich mit dem Leerwert.

TABELLE 4:

Glucoseaufnahme (mg Glucose/Std/g Fettgewebe)

Konzentration pro ml	1000 μ E Insulin	10 μ E Insulin	0 μ E Leerwert	1000 μ E Ins. C	40 γ Glucagon	40 γ Glu. C.	Ratte Nr.
mg/h/g							
	2,24	1,11	0,25	0,36	2,10	1,09	1
	1,85	1,14	0,35	0,29	1,66	1,17	2
	1,27	0,44	0,14	0,24	0,56	1,21	3
	1,98	0,83	0,19	0,94	1,88	1,21	4
	1,24	0,33	0,19	0,58	1,96	0,97	5
	1,84	0,72	0,14	1,00	1,07	0,98	6
	1,24	0,74	0,50	0,44	1,37	0,67	7
	0,95	0,71	0,41	0,29	1,25	0,84	8
	0,79	0,39	0,45	0,23	0,69	0,61	9
	2,15	1,39	0,30	0,25	2,62	1,51	10
	1,46	0,83	0,35	0,22	1,78	1,68	11
	2,06	0,70	0,51	0,34	2,20	1,22	12
	1,03	0,66	0,41	0,20	1,18	0,63	13
Mittelwert	1,55 $\pm$ 0,14	0,77 $\pm$ 0,09	0,32 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,08	1,56 $\pm$ 0,17	1,06 $\pm$ 0,11	
% des Leerwerts	485 $\pm$ 44	241 $\pm$ 29	100 $\pm$ 11	128 $\pm$ 23	488 $\pm$ 53	331 $\pm$ 34	
t	8,4	4,5	-	1,1	7,2	6,5	
p				> 0,05		< 0,001	

Messwerte der Glucoseaufnahme des isolierten epididymalen Rattenfettgewebes unter unbehandeltem Insulin und Glucose sowie unter Cystein-behandelten (C) Hormonen im Vergleich mit dem Leerwert.

TABELLE 5:

 $C^{14}O_2$ -Bildung aus D-Glucose-1- C^{14} (Imp/Min/mg Fett)

Konzentration pro ml	10 μE Insulin	0 μE Leerwert	40 γ Glu.C	4 γ Glu.C	0,4 γ Glu.C	0,04 γ Glu.C	Ratte Nr.
Imp/Min/mg							
	49,9	19,9	59,0	49,0	40,0	19,3	1
	79,6	23,0	49,3	38,0	35,9	21,4	2
	22,2	22,2	28,7	30,9	14,9	13,2	3
	65,0	18,3	85,0	40,5	44,7	25,4	4
	25,4	13,4	28,1	28,6	19,6	22,4	5
	62,0	44,0	73,7	60,4	42,0	30,0	6
	29,2	13,7	26,7	28,2	20,5	17,3	7
	100,0	43,2	77,0	42,7	46,4	22,4	8
	34,4	21,2	29,1	26,9	16,4	15,5	9
	88,3	24,5	46,3	51,0	42,2	35,0	10
	47,3	20,6	43,9	63,4	44,5	25,2	11
	38,4	17,7	52,4	36,1	33,2	17,2	12
	60,7	25,8	58,5	62,0	39,1	14,0	13
	24,4	12,6	97,0	81,0	56,7	24,6	14
	97,0	16,1	71,0	68,0	55,1	31,1	15
Mittelwert	54,92 $\pm$ 6,95	22,41 $\pm$ 2,45	55,05 $\pm$ 6,72	47,11 $\pm$ 4,32	36,74 $\pm$ 3,45	22,27 $\pm$ 1,75	
% des Leerwerts	245 $\pm$ 31	100 $\pm$ 11	245 $\pm$ 30	210 $\pm$ 19	164 $\pm$ 15	100 $\pm$ 8	
t	4,4	-	4,6	5,0	3,4	0	
P					$\approx$ 0,001		

Messwerte der $C^{14}O_2$ -Bildung des Rattenfettgewebes unter 4 verschiedenen Glucagon C - Konzentrationen zwischen 0,04 und 40 γ /ml im Vergleich mit 10 μE /ml Insulin und dem Leerwert.

pulszahl. (10-fache Steigerung der Insulin-Konzentration dagegen erhöhte die Impulszahl im Durchschnitt auf das 1,75-fache. - 48).

Um festzustellen, ob sich Insulin und Glucagon C gegenseitig in ihrer Wirkung auf die $C^{14}O_2$ -Produktion beeinflussen, wurden die Konzentrationen 10 $\mu E/ml$ Insulin mit 4 γ/ml Glucagon C gemeinsam und jede für sich getestet (Tabelle 6).

10 $\mu E/ml$ Insulin führten bei dieser Versuchsreihe zu keiner messbaren Steigerung des Leerwerts (102 %), sodass über einen potenzierenden Effekt der beiden Hormone nichts ausgesagt werden konnte. Eine gegenseitige Hemmung konnte nicht festgestellt werden.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei der gemeinsamen Wirkung des Insulins und Glucagons C auf die GA (Tabelle 7). In dieser Versuchsreihe konnten für 10 $\mu E/ml$ Insulin, 4 γ/ml Glucagon C und 0,4 γ/ml Glucagon C keine statistisch gesicherten Unterschiede gegenüber dem Leerwert erzielt werden. (Die untersuchten Tiere waren ältere, schwerere Ratten - 240 g -, möglicherweise als Ursache für die geringe GA des Fettgewebes zu betrachten).

Auf Grund der aus den ersten 5 Versuchsreihen gewonnenen Ergebnisse wurden in einem kombinierten Versuch die Wirkung von Insulin und Glucagon C auf die $C^{14}O_2$ -Produktion und die GA im gleichen Ansatz gemessen, um trotz der stark schwankenden Fettgewebs-Aktivität der Einzelratten eventuell vorhandene Wirkungsunterschiede der beiden Hormone feststellen zu können.

Die etwas abgeänderte Versuchsanordnung wurde oben beschrieben (S. 16). Die Ergebnisse aus 2 x 90 Einzelbestimmungen (Tabelle 8) ergaben zwischen Insulin- und Glucagon C-Wirkung einen deutlichen Unterschied. Ein Kriterium dafür ist das Verhältnis $C^{14}O_2$ -Impulszahl zu GA. Dieses Verhältnis vergrößert sich von 30 (Leerwert) mit steigender Insulin-Konzentration auf 61 bei 1000 $\mu E/ml$ Insulin. Insulin stimuliert somit spezifisch die $C^{14}O_2$ -Produktion aus Glucose-1- C^{14} im Fettgewebe, während es andere Verwertungsmöglichkeiten der aufgenommenen Glucose wenig oder garnicht beeinflusst. Glucagon dagegen verändert das Verhältnis des Leerwerts nicht, d.h. Glucagon stimuliert die $C^{14}O_2$ -Produktion aus der Glucose-1- C^{14} in geringerem Masse als Insulin, andere Verwertungsmöglichkeiten der aufgenommenen Glucose aber in gleichem Ausmass.

Aus einer Gegenüberstellung der Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen bei den gleichen untersuchten Konzentrationen (Tabelle 9) ergab sich ein stark schwankender Glucose-Verbrauch des Fettgewebes der einzelnen Versuchsgruppen. Ausserdem war das Reaktionsvermögen des Gewebes gegenüber Insulin und Glucagon nicht immer gleichmässig ausgeprägt. So zeigte sich in Gruppe 4, 6a, 6b trotz schlechter Insulin-Empfindlichkeit ein guter Glucagon-Effekt.

TABELLE 6:

 $C^{14}O_2$ -Bildung aus D-Glucose-1- C^{14} (Impulse/Min/mg Fett)

Konzentration pro ml	1000 μE Insulin	10 μE Insulin	0 μE Leerwert	4 γ Glu. C	0,4 γ Glu. C	10 μE Insulin + 4 γ Glu. C	Ratte Nr.
Imp/Min/mg							
	103,5	27,1	26,4	42,3	51,6	43,2	1
	206,0	26,4	24,0	53,5	43,7	83,4	2
	191,0	39,2	30,0	87,0	47,5	111,0	3
	161,0	20,4	22,5	72,5	45,3	65,6	4
	77,8	13,2	13,0	15,9	20,6	15,1	5
	212,0	34,0	19,0	98,0	55,3	97,5	6
	109,0	14,1	21,2	43,3	35,6	38,8	7
	108,0	17,8	17,5	46,5	46,8	58,0	8
	139,0	27,6	19,2	55,0	36,7	61,5	9
	146,0	16,4	25,9	48,5	28,2	56,8	10
	206,0	20,5	30,5	68,9	52,5	78,9	11
	171,0	20,2	28,8	70,0	41,0	68,5	12
	132,5	25,8	18,0	66,0	65,4	64,5	13
Mittelwert	150,98 ± 12,3	23,28 ± 2,13	22,77 ± 1,5	59,03 ± 5,93	43,86 ± 3,28	64,84 ± 6,94	
% des Leerwerts	683 ± 54	102 ± 9	100 ± 7	259 ± 26	193 ± 14	284 ± 30	
t	10,3	0,2	-	5,9	5,9	5,9	

Messwerte der $C^{14}O_2$ -Bildung des Rattenfettgewebes unter gemeinsamem und getrenntem Einfluss von 4 γ /ml Glucagon C und 10 μE /ml Insulin.

TABELLE 7:

Glucoseaufnahme (mg Glucose/Std/g Fett)

Konzentration pro ml	100 μ E Insulin	10 μ E Insulin	0 μ E Leerwert	4 γ Glu., C	0,4 γ Glu., C	10 μ E Insulin + 4 γ Glu., C	Ratte Nr.
mg/Std/g							
	0,81	0,68	0,58	0,86	0,52	0,64	1
	0,50	0,38	0,21	0,27	0,22	0,04	2
	0,44	0,00	0,08	0,17	0,10	0,34	3
	0,69	0,08	0,09	0,21	0,00	0,41	4
	0,35	0,25	0,21	0,31	0,38	0,31	5
	1,02	0,73	0,38	0,44	0,41	0,83	6
	0,61	0,45	0,27	0,54	0,52	0,50	7
	0,74	0,58	0,35	0,72	0,66	0,71	8
	0,80	0,66	0,32	0,63	0,54	0,80	9
	0,57	0,36	0,38	0,53	0,31	0,25	10
	0,41	0,20	0,38	0,59	0,46	0,62	11
	0,95	0,65	0,50	0,97	0,65	0,53	12
	0,78	0,34	0,41	0,42	0,78	0,56	13
	0,53	0,43	0,58	0,69	0,60	0,79	14
Mittelwert	0,66 + 0,06	0,41 + 0,06	0,34 + 0,04	0,53 + 0,06	0,44 + 0,06	0,52 + 0,06	
% des Leerwerts	194 + 17	121 + 19	100 + 13	156 + 19	130 + 17	153 + 18	
t	4,4	0,9	-	2,5	1,4	2,4	

Messwerte der Glucoseaufnahme des Rattenfettgewebes unter gemeinsamem und getrenntem Einfluss von 4 γ /ml Glucagon C und 10 μ E/ml Insulin.

TABELLE 8:

8 a $C^{14}O_2$ -Bildung aus D-Glucose-1- C^{14} (Imp/Min/mg Fett)

Konzentration pro ml	1000 μE Insulin	100 μE Insulin	10 μE Insulin	0 μE Leerwert	40 γ Glu.C	4 γ Glu.C	Ratte Nr.
a) I/M/mg	108,0	77,4	49,7	16,6	47,8	39,7	1
	74,5	25,0	17,4	23,3	30,8	22,2	2
	158,0	56,5	25,2	31,8	39,8	37,2	3
	180,0	70,0	35,9	15,8	46,4	32,9	4
	107,5	31,5	14,5	17,8	51,0	27,1	5
	117,6	37,7	17,9	15,2	86,3	53,0	6
	69,3	31,5	14,7	17,3	22,5	22,6	7
	50,8	25,7	15,9	14,0	39,0	35,4	8
	85,2	39,0	10,7	11,8	30,7	34,1	9
	50,6	26,0	19,2	19,5	20,5	19,7	10
	74,0	34,4	36,2	23,3	21,9	17,7	11
	58,3	14,4	20,7	14,3	25,8	25,5	12
	113,0	52,9	43,0	19,4	38,5	25,7	13
	87,3	23,4	21,6	9,7	39,6	28,2	14
	137,5	90,5	25,2	17,2	66,5	72,5	15
Mittelwert	98,1	42,4	24,5	17,8	40,5	32,9	
	$\pm 10,2$	$\pm 5,8$	$\pm 3,0$	$\pm 1,4$	$\pm 4,6$	$\pm 3,7$	
% des Leerwerts	550	239	138	100	226	185	
	± 57	± 32	± 17	± 8	± 26	± 21	
t	7,8	4,1	2,0	-	4,7	3,8	

8 b Glucoseaufnahme (mg Glucose/Std/g Fett)

Konzentration pro ml	1000 μE Insulin	100 μE Insulin	10 μE Insulin	0 μE Leerwert	40 γ Glu.C	4 γ Glu.C	Ratte Nr.
b) mg/h/g Fett	1,69	1,36	1,03	0,55	1,30	1,13	1
	1,51	0,72	0,72	0,89	1,28	0,79	2
	2,14	1,10	0,46	0,74	1,19	1,02	3
	2,38	1,12	0,73	0,55	1,50	0,85	4
	1,38	0,52	0,56	0,39	1,23	0,79	5
	1,53	1,12	0,58	0,56	1,93	1,62	6
	1,23	0,56	0,39	0,42	0,59	0,53	7
	0,77	0,43	0,38	0,30	1,10	1,04	8
	1,25	0,80	0,35	0,28	1,12	1,12	9
	1,57	1,22	1,02	1,10	1,27	1,34	10
	1,48	1,09	1,12	0,71	1,44	0,78	11
	1,20	0,81	0,92	0,90	1,26	1,47	12
	1,68	0,95	0,84	0,36	1,29	0,97	13
	1,78	0,36	0,38	0,73	1,42	1,12	14
	2,38	1,73	0,75	0,55	1,86	1,86	15
Mittelwert	1,60	0,93	0,68	0,60	1,32	1,10	
	$\pm 0,11$	$\pm 0,10$	$\pm 0,08$	$\pm 0,06$	$\pm 0,08$	$\pm 0,09$	
% des Leerwerts	267	155	113	100	220	183	
	± 18	± 17	± 13	± 10	± 13	± 15	
t	7,8	2,8	0,8	-	7,1	4,5	

 $C^{14}O_2$ (I/M/mg)

GA (mg/h/g)

61	46	36	30	30	30
----	----	----	----	----	----

Messwerte der $C^{14}O_2$ -Bildung und der Glucoseaufnahme des Rattenfettgewebes aus dem gleichen Inkubationsansatz unter Insulinkonzentrationen von 10-1000 $\mu E/ml$ und Glucagon C-Konzentrationen von 4 und 40 γ/ml .

TABELLE 9:

A) $C^{14}O_2$ -Produktion in % des Leerwerts

Konz. pro ml	1000 μE Insulin	100 μE Insulin	10 μE Insulin	0 μE Leerwert	40 γ Glu. C	4 γ Glu. C	0,4 γ Glu. C	10 μE Insulin + 4 γ Glu. C	Gruppe	Tab.
	740	-	280	100	266	-	-	-	1	3
	-	-	245		245	210	164	-	3	5
	663	-	102		-	259	193	284	4	6
	550	239	138		226	185	-	-	6a	8a

B) Glucoseaufnahme in % des Leerwerts

Konz. pro ml	1000 μE Insulin	100 μE Insulin	10 μE Insulin	0 μE Leerwert	40 γ Glu. C	4 γ Glu. C	0,4 γ Glu. C	10 μE Insulin + 4 γ Glu. C	Gruppe	Tab.
	485	-	241	100	331	-	-	-	2	4
	-	194	121		-	156	130	153	5	7
	267	155	113		220	183	-	-	6b	8b

Vergleich der prozentualen ($\text{Leerwert} = 100\%$) $C^{14}O_2$ -Produktion (A) und der Glucoseaufnahme (B) des isolierten epididymalen Rattenfettgewebes in vitro bei den verschiedenen Hormonkonzentrationen und Versuchsgruppen.

D) DISKUSSION

RANDLE (24) und NAUGHT (25) fanden am Rattenzwerchfell bzw. an der laktierenden Rattenmammary keinen selbständigen Effekt des Glucagons auf die Glucose-Aufnahme. Im Gegensatz dazu war der stimulierende Einfluss des Glucagons auf die Glucose-Verarbeitung des epididymalen Fettanhangs der Ratte in vorliegender Arbeit selbständig und nicht durch Insulin oder Cystein bedingt.

Er wird durch folgende Punkte nahegelegt:

- 1) Trotz Inaktivierung des im Glucagon enthaltenen Insulins durch Cystein zeigte Glucagon C eine signifikante Steigerung der $C^{14}O_2$ -Produktion aus Glucose-1- C^{14} und der Gesamt-Glucose-Aufnahme (Tabelle 3 und 4).
- 2) Insulin wurde durch die Behandlung mit Cystein vollständig inaktiviert und Cystein (Insulin C) hatte keinen Einfluss auf den Glucoseverbrauch des Fettgewebes (Tabelle 3 und 4).
- 3) Eine 10-fache Glucagon C-Konzentration führte im Durchschnitt zu einer 1,25-fachen Steigerung der $C^{14}O_2$ -Produktion aus Glucose-1- C^{14} , während eine 10-fache Insulin-Dosis die $C^{14}O_2$ -Produktion durchschnittlich auf das 1,75-fache steigerte (48).
- 4) Glucagon C veränderte das Verhältnis $C^{14}O_2$ -Produktion zu Glucose-Aufnahme in kombinierten Versuchen nicht, während Insulin dieses Verhältnis vergrößerte (bei 1000 $\mu E/ml$ Insulin ungefähr auf das Doppelte des Leerwerts), weil es die C-1-Oxydation der Glucose "anscheinend selektiv" (WINEGRAD (39)) stimuliert.
- 5) Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen ergab, dass bei gleichen Konzentrationen die Insulin- und Glucagon-Empfindlichkeit des Fettgewebes nicht immer parallel liefen. (Bei Gruppe 4, 6a, 6b (Tab. 9) konnte trotz schlechter Insulin-Empfindlichkeit ein guter Glucagon-Effekt festgestellt werden).

Die kleinste wirksame Glucagon-Konzentration (0,4 γ/ml) war gewichtsmäßig 1000 mal höher als die kleinste wirksame Insulin-Konzentration (10 $\mu E/ml$ = 0,0004 γ/ml , da eine Einheit Insulin etwa 40 γ Insulin entsprechen). Die Aktivität des getesteten Glucagon-Präparates entsprach etwa der des von A. STAUB (52) kristallisierten HGF. Dieser steigert in einer Konzentration von 0,05 γ/kg Körpergewicht den Blutzuckerwert einer 24 Std. nüchternen anästhesierten Katze um 30 mg% (53). Da diese kleinste Blutzucker-steigernde HGF-Konzentration (0,05 γ/kg = 0,0003 γ/ml bei ungefähr 300 ml extrazellulärem Raum einer 2 kg schweren Katze) etwa in der Größenordnung der kleinsten auf das Fettgewebe in vitro wirksamen Insulin-Dosis (0,0004 γ/ml) liegt, ist es unwahrscheinlich, dass 0,4 γ/ml HGF physiologisch auf die Glucose-Verarbeitung des Fettgewebes zur Wirkung gelangt. Trotzdem liegt eine physiologische Wirkung des HGF auf das Fettgewebe im Bereich des Möglichen, da nach MAKMAN (54) im Blut des Menschen und des Hundes Glucagon-Konzentrationen von etwa 0,07 γ/ml vorkommen sollen. - Der in vorliegender Arbeit gezeigte Glucagon-Effekt könnte somit als

Wirkung des physiologisch überdosierten HGF gedeutet werden. Ob er HGF-spezifisch ist, oder als "Eiweisswirkung" unspezifisch, muss noch geklärt werden.

Die Annahme, ein bei der Cystein-Behandlung entstandenes Kunstprodukt habe die Steigerung des Glucose-Verbrauchs bedingt, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschliessen, da das Glucagon auch nach einer Behandlung mit Lauge und Temperatursteigerung zur Insulin-Inaktivierung die Glucose-Aufnahme des Fettgewebes steigert (47). Schliesslich könnte noch an eine unbekannte, in dem untersuchten Glucagon-Präparat in Spuren vorhandene Substanz gedacht werden, die in ähnlich minimalen Konzentrationen wie das Insulin wirkt, aber im Gegensatz zum Insulin durch die Cystein-Behandlung nicht inaktiviert wurde.

Eine ähnliche Steigerung des Glucose-Umsatzes des Rattenfettgewebes unter Glucagon-Einfluss wie in vorliegender Arbeit fanden zur gleichen Zeit mit anderer Methodik auch FROESCH (55) und LEE (56).

E) ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Es wurden vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Glucagon und Insulin auf die $C^{14}O_2$ -Bildung aus D-Glucose-1- C^{14} und die Glucose-Aufnahme des epididymalen Fettanhanges der Ratte in vitro durchgeführt.
- 2) Glucagon wurde mit Cystein vorbehandelt, um darin enthaltenes Insulin zu inaktivieren.
- 3) Durch Glucagon-Konzentrationen von 40 γ /ml bis 0,4 γ /ml wurde die $C^{14}O_2$ -Produktion durchschnittlich auf 250 - 175 % des Leerwerts, der Gesamt-Glucose-Verbrauch auf 275 - 150 % gesteigert.
- 4) Durch Insulin-Konzentrationen von 0,04 γ /ml (1000 μE /ml) bis 0,0004 γ /ml (10 μE /ml) wurde die $C^{14}O_2$ -Produktion durchschnittlich auf 650 - 190 % des Leerwerts, der Gesamt-Glucose-Verbrauch auf 375 - 160 % gesteigert.
- 5) Diese "anscheinend selektive" Stimulation der C-1-Oxydation der Glucose durch Insulin - im Gegensatz zum Glucagon - ist ein wesentlicher Wirkungsunterschied zwischen den beiden Hormonen.

Herrn Dr. K.F. WEINGES bin ich für die verständnisvolle wissenschaftliche Anleitung und die Korrektur meiner Dissertation zu bestem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. K. DIRNAGL danke ich dafür, dass die radioaktiven Messungen am Liquid-Scintillation-Spektrometer des Balneologischen Instituts durchgeführt werden konnten.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frä. H. KETTL für ihre unermüdliche technische Assistenz.

F) LITERATUR

1. FOA, P.P., GALANSINO, G., POZZA, G. :
Glucagon, a second Pancreatic Hormon.
Rec.Prog.Hormone Research, Vol. XIII, 473 (1957).
2. FOA, P.P., GALANSINO, G. :
Glucagon.
Prog.Clin.Endocrinol., Vol. II im Druck (1960).
3. ELRICK, H., STAUB, A., MASKE, H. :
Recent Developments in Glucagon Research.
New England J. Med., 256, 742 (1957).
4. BERTHET, J. :
Some Aspects of the Glucagon Problem.
Am.J. of Medicine 5, 703 (1959).
5. BERGEN, S.S., VAN ITALLIE, T.B. :
Glucagon - An Interim Report.
Metabolism 2, 132 (1960).
6. SUTHERLAND, E.W., CORI, C.F. :
Effect of Hyperglycemic Factor and Epinephrine on Liver Phosphorylase.
J. biol. Chem. 188, 531 (1951).
7. SUTHERLAND, E.W., WOSILAIT, W.D., RALL, T. :
Effect of Epinephrine and Glucagon on Activation of Liver Phosphorylase.
Fed. Proc. 14, 289 (1955).
8. SUTHERLAND, E.W., WOSILAIT, W.D., RALL, T.W. :
The Action of Glucagon on Liver Phosphorylase.
Ciba Coll. Endocrin. 9, 179 (1956).
9. ELRICK, H., HLAD, C.J. jun., WITTEN, T. :
The Enhancement of Peripheral Glucose Utilization by Glucagon.
J. clin. Invest. 34, 1830 (1955).
10. ELRICK, H., HLAD, C.J. jun., ARAI, Y., SMITH, A. :
The Interaction of Glucagon and Insulin on Blood Glucose.
J. clin. Invest. 35, 757 (1956).
11. ELRICK, H., ARAI, Y., HLAD, C.J. jun. :
The Action of Glucagon-Insulin Mixtures in Diabetic Patients.
J. clin. Endocrin. and Metab. 18, 825 (1958).

12. SCHWAMM, H. : Die periphere Glucoseverwertung nach intravenöser Glucagonbelastung.
Helv. paediat. Acta 12, 361 (1957).
13. VAN ITALLIE, T. B., MORGAN, M. C., DOTTI, L. B., LIN, H. J. :
Effect of Glucagon on Peripheral Utilization of Glucose in Man.
J. clin. Endocr. 15, 28 (1955).
14. BONDY, P. K., CARDILLO, L. R. :
The Effect of Glucagon on Carbohydrate Metabolism in Normal Human Beings.
J. clin. Invest. 35, 494. (1956).
15. WEINGES, K. F. : Der Einfluss eines protrahiert wirkenden Glucagons auf den Blutzucker, das anorganische Serumphosphat und die Gesamtaminosäuren im Serum.
Arch. exp. Path. u. Pharmak. 237, 22 (1959).
16. WEINGES, K. F. : Stoffwechseluntersuchungen mit einem verzögert wirkenden Glucagon an Gesunden und Diabetikern.
Verh. d. Dtsch. Ges. f. Innere Med. 66, 207 (1960).
17. WEINGES, K. F. : Beitrag zur Klärung der Frage einer anabolen oder katabolen Stoffwechselwirkung des zweiten Pankreas-hormons Glucagon (HGF).
Int. Symp. Endocrin. im Druck (1960).
18. ENGEL, F. L., SCOTT, J. L. jun. :
The Role of Hormones in Adipose Glycogen Synthesis in the Rat. Insulin and the Hyperglycemic Factor of the Pancreas.
Endocr. 46, 574 (1950).
19. INGLE, D. J., NEZAMIS, J. E., HUMPHREY, L. M. :
Absence of Hyperglycemic Effect of Glucagon in the Eviscerate Rat.
Proc. soc. exp. Biol. (N. Y.) 84, 232 (1953).
20. DRURY, D. R., WICK, A. N., SHERILL, J. W. :
The Effect of Hyperglycemic Factor on the Metabolism of Glucose by Extrahepatic Tissues.
Diabetes (N. Y.) 3, 129 (1954).
21. PINCUS, I. J., GRICE, M. S., DUNN, M., RUTMAN, J. Z. :
Effect of Glucagon (HGF) on Deposition of Muscle Glycogen.
Amer. J. Physiol. 183, 413 (1955).

22. CANDELA, J. L. , CANDELA, R. :
Inhibitory Effect of Glucagon on the Insulin Glucose
Uptake of the Isolated Diaphragm of the Rat.
Cib.Found.Coll.Endocr. 9, 194 (1956).
23. SNEDECOR, J. G. , DE MEIO, R. H. , PINCUS, I. J. :
Reduction by Glucagon of Glycogen Deposition Effect of
Insulin in Rat Diaphragm.
Proc.soc.exp.Biol. (N.Y.) 89, 396 (1955).
24. RANDLE, P. J. :
The Effect of Glucagon preparations on the Uptake of
Glucose by isolated Rat Diaphragm.
J.Endocrin. 17, 396 (1958).
25. McNAUGHT, M. L. : The Use of the Mammary-Slice Bioassay Method for the
Estimation of Insulin in Glucagon.
J.Endocrin. 17, 16 (1958).
26. MIRSKI, A. :
Metabolism of Adipose Tissue in vitro.
Biochem.J. 36, 232 (1942).
27. TUERKISCHER, E. , WERTHEIMER, E. :
Factors influencing Deposition of Glycogen in Adipose
Tissue of the Rat.
J.Physiol. 104, 361 (1946).
28. WERTHEIMER, E. , SHAPIRO, B. :
The Physiology of Adipose Tissue.
Physiol.Rev. 28, 451 (1948).
29. SHAPIRO, B. , WERTHEIMER, E. :
The Synthesis of Fatty Acids in Adipose Tissue in vitro.
J.biol.Chem. 173, 725 (1948).
30. FAWCETT, D. W. :
Histological Observations on the Relation of Insulin to
the Deposition of Glycogen in Adipose Tissue.
Endocrin. 42, 454 (1948).
31. RENOLD, A. , FAWCETT, D. W. , MARBLE, A. :
The action of insulin on glycogen deposition in adipose
tissue.
J.clin.Invest. 28, 805 (1949).
32. KRAHL, M. E. :
The effect of insulin and pituitary hormones on glucose
uptake in muscle.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 54, 649 (1951).

33. HAUGAARD, N. , MARSH, J. B. :
Effect of Insulin on the Metabolism of Adipose Tissue
from Normal Rats.
J. biol. Chem. 194, 33 (1952).
34. HAUSBERGER, F. X. , MILSTEIN, S. W. , RUTMAN, J. R. :
The influence of Insulin on Glucose Utilization in
Adipose and Hepatic Tissues in vitro.
J. biol. Chem. 208, 431 (1954).
35. HAUSBERGER, F. X. , MILSTEIN, S. W. :
Dietary Effects on Lipogenesis in Adipose Tissue.
J. biol. Chem. 214, 483 (1955).
36. SHAPIRO, B. , WERTHEIMER, E. :
The Metabolic Activity of Adipose Tissue - A Review.
Metabolism 5, 79 (1956).
37. MILSTEIN, S. W. :
Oxydation of Specifically Labeled Glucose by Rat
Adipose Tissue.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 92, 632 (1956).
38. ITZHAKI, S. , WERTHEIMER, E. :
Metabolism of Adipose Tissue in vitro: Nutritional
Factors and Effect of Insulin.
Endocrin. 61, 72 (1957).
39. WINEGRAD, A. T. , RENOLD, A. E. :
Studies on Rat Adipose Tissue in Vitro. I. Effects of
Insulin on the Metabolism of Glucose, Pyruvate and
Acetate. II. Effects of Insulin on the Metabolism of
Specifically Labeled Glucose.
J. biol. Chem. 233, 267 u. 273 (1958).
40. FAVARGER, P. , GERLACH, J. :
Recherches sur la synthèse des graisses à partir d'acétate
ou de glucose. II. Les rôles respectifs du foie, du tissu
adipeux et de certains autres tissus dans la lipogenèse
chez la souris.
Helv. physiol. pharmacol. Acta 13, 96 (1955).
41. FELLER, D. D. , FEIST, E. :
Metabolism of Adipose Tissue. II. Incorporation of
Propionate Carbon into Lipides by Slices of Adipose
Tissue.
J. biol. Chem. 228, 275 (1957).

42. RENOLD, A. E., MARBLE, A., FAWCETT, D. W. :
 Action of Insulin on Deposition of Glycogen and
 Storage of Fat in Adipose Tissue.
 Endocrin. 46, 55 (1950).
43. MARTIN, D. B., RENOLD, A. E., DAGENAIS, Y. M. :
 An Assay For Insulinlike Activity Using Rat Adipose
 Tissue.
 Lancet II, 76 (1958).
44. STAUB, M. :
 Biol. Bestimmungsmethoden für Insulin mit Zwerchfell
 und epididymalem Fettgewebe der Ratten in vitro.
 Schweiz. med. Wschr. 1958, 831.
45. DITSCHUNEIT, H., CHANG-SU AHN, PFEIFFER, M., PFEIFFER, E. F. :
 Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididy-
 malen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glu-
 cose.
 Kli. Wo. 23, 1234 u. 1239 (1959).
46. HUMBEL, R. E. :
 Messung der Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem
 Rattenfettgewebe in vitro.
 Exp. Basel, Schweiz. Vol. XV/7, 256 (1959).
47. FROESCH, E. R. :
 persönl. Mitteilung Zürich 1960.
48. WEINGES, K. F., WÖRNER, H. :
 Über den Einfluss von Insulin und Glucagon auf den
 Glucosestoffwechsel des epididymalen Fettanhangs der
 Ratte in vitro.
 I. Der Einfluss von Insulin und die sich daraus ergebende
 Möglichkeit der Bestimmung einer insulinähnlichen Ak-
 tivität im menschlichen Blut.
 Kli. Wo. 39, 238 (1961).
49. STAUB, A., BEHRENS, O. K. :
 The Glucagon Content of Crystalline Insulin Prepara-
 tions.
 J. clin. Invest. 12, 1629 (1954).
50. EISENBERG, F. jun. :
 Liquid-Scintillation-Counting, herausgegeben von
 Packard Instrument Comp. La Crange/Illinois 1957.
51. HUGGET, A. S. G., NIXON, D. A. :
 Enzymatic determination of blood glucose.
 Biochem. J. 66, 12 P (1957). -
 Lancet II, 368 (1957).

52. STAUB, A., SINN, L., BEHRENS, O. K. :
Purification and Crystallization of Hyperglycemic
Factor.
Science 117, 628 (1953).
53. STAUB, A., SINN, L., BEHRENS, O. K. :
Purification and Crystallization of Glucagon.
J. Biol. Chem. 214, 619 (1955).
54. MAKMAN, M. H., MAKMAN, R. S., SUTHERLAND, E. W. :
Presence of a Glucagon-like Material in Blood of Man
and Dog.
J. biol. Chem. 233, 894 (1958).
55. FROESCH, E. R., GUHL, U., BALLY, P., ZIEGLER, W., LABHART, A. :
Hormonal Interference in the in vitro Insulin Bioassay
with the Epididymal Fat Pad of the Rat.
First international Congress of Endocrinology, Copen-
hagen (1960).
(Advance Abstracts of short Communication, herausgeg.
von F. Fuchs, Periodica Copenhagen 1960 p.1237).
56. LEE, H. M., ELLIS, R. M., BROMER, W. W. :
Insulin-like Activity of Crystalline Glucagon as
measured with Rat Epididymal Fat Pad Preparation.
Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 104, 4 (1960).

LEBENS LAUF

Am 1. Mai 1934 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Ernst Wörner und seiner Ehefrau Berta geb. Koerner in Stuttgart geboren. Ich bin deutscher Staatsangehöriger. Mit meinen drei jüngeren Schwestern erlebte ich im Hause meiner Eltern eine sorglose Jugend.

1940 kam ich in Stuttgart-Sillenbuch zur Schule. 1944 bestand ich die Aufnahmeprüfung in die Hohenstaufen-Oberschule Göppingen. Nach dem Besuch der Wagenburg-Oberschule Stuttgart und der Dillmann-Oberschule Stuttgart wurde mir an der Oberschule Schorndorf im Winter 1953/54 das Zeugnis der Reife erteilt.

Wegen einer zweijährigen Krankheit, durch die mein linkes Hüftgelenk versteifte, konnte ich mein Medizinstudium erst im Sommersemester 1956 an der Universität Tübingen beginnen. Dort bestand ich nach fünf vorklinischen Semestern im Oktober 1958 das Physikum.

Nach einem klinischen Semester in Tübingen und fünf Semestern in München habe ich im Herbst 1961 an der Universität in München das medizinische Staatsexamen abgelegt.

